อนุกรมวิธานและเมแทบอไลท์ทุติยภูมิของแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกและโมแนสคัส เกาเหลียง เคบี20เอ็ม10.2

นางสาว สุชาดา จงรุ่งเรืองโชค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1231-2

TAXONOMY AND SECONDARY METABOLITES OF SELECTED ACTINOMYCETE STRAINS AND *MONASCUS KAOLIANG* KB20M10.2

Miss Suchada Jongrungruangchok

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic year 2004

ISBN 974-53-1231-2

Thesis Title	TAXONOMY AND SECONDARY METABOLITES OF SELECTED ACTINOMYCETE STRAINS AND *MONASCUS KAOLIANG* KB20M 10.2
By	Miss Suchada Jongrungruangchok
Filed of study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Associate Professor Somboon Tansupawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Rapepol Bavovada, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Rapepol Bavovada, Ph.D.)

..... Member

(Professor Busaba Yongsmith, Ph.D.)

..... Member

(Prasat Kitakoop, Ph.D.)

สุชาดา จงรุ่งเรืองโชค : อนุกรมวิธานและเมแทบอไลท์ทุติยภูมิของแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกและโมแนสคัส เกาเหลียง เคบี20เอ็ม10.2. (TAXONOMY AND SECONDARY METABOLITES OF SELECTED ACTINOMYCETE STRAINS AND *MONASCUS KAOLIANG* KB20M 10.2) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.รพีพล ภโววาท, 216 หน้า. ISBN 974-53-1231-2.

ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิและการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ พบว่าเชื้อ 12 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ PNK1-3, PNK1-5, TT2-9 และ KN-6 เป็นแบคทีเรียในสกุล สเตรปโตมัยซิส FLM-2 เป็น คีตาสโตสปอรา MA-1, MA-2, JSM1-1, JSM1-3, MC5-1, MC7-1 และ R1-1 เป็นไมโครโมโนสปอราโดยใช้ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีรวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA พบว่าเชื้อเหล่านี้มี phospholipids ชนิด phosphatidylethanolamine เป็นองค์ประกอบหลัก รวมทั้งมีกรดไขมันส่วนใหญ่แบบ iso-$C_{16:0}$, iso-$C_{15:0}$, iso-$C_{17:0}$, anteiso-$C_{16:0}$, anteiso-$C_{15:0}$, และ anteiso-$C_{17:0}$ และมี menaquinones ชนิด MK-9(H_4), MK-9(H_6) หรือ MK-10(H_4) นอกจากนี้พบว่ามีปริมาณ G+C ของสาย DNA อยู่ในช่วง 71-73 mol% สเตรปโตมัยซิส คีตาสโตสปอรา และ ไมโครโมโนสปอรา มีกรด LL, LL และ*meso*-diaminopimelic และ*meso*-diaminopimelic ในผนังเซลล์ตามลำดับ ไมโครโมโนสปอรามีน้ำตาล xylose และ arabinose เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ จากผลความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA (99.9%) สามารถพิสูจน์ว่า PNK1-3 เป็น *S. hygroscopicus* ขณะที่ FLM-2 มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA (97.1%)ใกล้เคียงกับ *K. melanogena* จากผลของความคล้ายคลึงทาง DNA และลักษณะทางฟีโนไทป์สามารถแบ่งแยกเชื้อไมโครโมโนสปอรา 7 สายพันธุ์เป็น 3 กลุ่ม และแสดงผลของความคล้ายคลึงทาง DNA ในระดับต่ำ (28.7-43.1%) และลำดับเบสในช่วง 16S rDNA (97.5-99.3%) รวมทั้งมีลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างไปจากเชื้อไมโครโมโนสปอราที่เคยมีรายงานไว้ จึงสามารถจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ และได้เสนอชื่อสำหรับเชื้อกลุ่มที่ 1 (2 สายพันธุ์) เป็น *Micromonospora krabiensis* กลุ่มที่ 2 (2 สายพันธุ์) เป็น *Micromonospora marinus* และกลุ่มที่ 3 (3 สายพันธุ์) เป็น *Micromonospora chaiyaphumensis* ตามลำดับ จากการศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อที่คัดเลือกสายพันธุ์ PNK1-3 พบว่าสามารถแยกสิ่งสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากน้ำหมักเชื้อซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ได้สารในกลุ่ม ansamycin 1 ชนิด คือ geldanamycin แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (*Candida albicans* ATCC 10231) เชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ human epidermoid และ breast cancer cell lines

จากการศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อกลายพันธุ์ *Monascus kaoliang* KB20M10.2 ที่เจริญบนข้าว พบว่าสามารถแยกสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนได้สารสีใหม่กลุ่ม azaphilones 2 ชนิด คือ monascusone A (6,7-dihydroxy-3(2-hydroxypropyl)-7- methyl-1,5,6,7-tetrahydroisochromen-8-one) และ monascusone B และสาร azaphilones ที่เคยมีรายงาน 2 ชนิด monascin A และ FK17-P2b2 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล UV, IR, MS และ NMR spectroscopy สาร monascusone A นี้ ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....สุชาดา จงรุ่งเรืองโชค.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

44769708 33 MAJOR: PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS

KEY WORDS: ACTINOMYCETES / *MICROMONOSPORA* / *MONASCUS* / ANSAMYCIN / AZAPHILONE

SUCHADA JONGRUNGRUANGCHOK: TAXONOMY AND SECONDARY METABOLITES OF SELECTED ACTINOMYCETE STRAINS AND *MONASCUS KAOLIANG* KB20M10.2. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. RAPEPOL BAVOVADA. Ph.D., 216 pp. ISBN 974-53-1231-2.

In the course of our investigation for bioactive metabolites and taxonomy of 12 actinomycete strains isolated from soils, all possessed antimicrobial activities, PNK1-3, PNK1-5, TT2-9, KN-6 were identified as *Streptomyces*; FLM-2 as *Kitasatospora*; and MA-1, MA-2, JSM1-1, JSM1-3, MC5-1, MC7-1 and R1-1 as *Micromonospora* based on the phenotypic and chemotaxonomic characteristics including the phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences. The tested strains contained phosphatidylethanolamine as characteristic phospholipids (type II); iso-$C_{16:0}$, iso-$C_{15:0}$, iso-$C_{17:0}$, anteiso-$C_{16:0}$, anteiso-$C_{15:0}$, and anteiso-$C_{17:0}$ as major fatty acids; and MK-9(H_4), MK-9(H_6), or MK-10(H_4) as major menaquinones. The range of G+C content of the DNA was 71-73 mol%. *Streptomyces, Kitasatospora*, and *Micromonospora* are LL, LL and *meso*, and *meso*-diaminopimelic acid in cell wall, respectively. Whole-cell sugar of *Micromonospora* contained xylose and arabinose (pattern D). The potent selected strain, PNK1-3 was identified as *S. hygroscopicus* (99.9% 16S rDNA similarity), while FLM-2 was closed to *K. melanogena* (97.1% 16S rDNA similarity). On the basis of DNA-DNA similarity and phenotypic characteristics, 7 strains of *Micromonospora* could be separated into three groups. A low level of DNA-DNA similarity (28.7-43.1%) and 16S rDNA similarity (97.5-99.3%) including the phenotypic characteristics indicated that these strains were distinguished from all of validly described *Micromonospora* species. The names *Micromonospora krabiensis* sp. nov., *Micromonospora marinus* sp. nov and *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov. are proposed for Group I (2 strains), Group II (2 strains) and Group III (3 strains), respectively. PNK1-3 was selected for secondary metabolite production and elucidated chemical structure. The ETOAc extract from fermentation broth yielded known ansamycin, geldanamycin which exhibited antifungal activity (*Candida albicans* ATCC10231), antimalarial (*Plasmodium falciparum*), antituberculosis activity (*Mycobacterium tuberculosis*), cytotoxicity activity against human epidermoid and breast cancer cell lines.

For exploration the secondary metabolites of a yellow mutant *Monascus kaoliang* KB20M10.2 grown on rice, CH_2Cl_2 extract yielded two new azaphilone pigments, monascusone A (6,7-dihydroxy-3(2-hydroxypropyl)-7-methyl-1,5,6,7-tetrahydroisochromen-8-one) and monascusone B, together with two known azaphilones, monascin A and FK17-P2b2. Structures of isolated compounds were elucidated through extensive analyses of their UV, IR, MS, and NMR spectroscopic data. Monascusone A showed no antimicrobial activity.

Field of study Pharmaceutical Chemistry and Natural products

Academic year 2004

Student's signature.....jongrungruangchok.....

Advisor's signature.....Somboon Tanasupawat.....

Co-advisor's signature.....Rapepol Bavovada.....

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

TABLE **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF SCHEMS

LIST OF ABBREVATIONS AND SYMBOLS

$[\alpha]^{28}D$	=	Specific rotation at 28° and sodium D line (589 nm)
α	=	Alpha
Ala	=	Alanine
Ara	=	Arabinose
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.
$Ba(OH)_2$	=	Barium hydroxide
BC	=	Breast cancer cell line
°C	=	Degree Celsius
^{13}C-NMR	=	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
$CDCl_3$	=	Deuterated chloroform
CFU	=	Colony forming unit
$CHCl_3$	=	Chloroform
cm	=	Centimeter
COSY	=	Correlation spectroscopy
Cz. Sucrose	=	Czapek's sucrose
δ	=	Chemical shift
d	=	Doublet
DDBJ	=	DNA Data Bank of Japan
DEPT	=	Distortionless enchancement by polarization transfer
DMF	=	Dimethyl formamide
DMSO-d_6	=	Deuterated dimethylsulphoxide
DON	=	2,7-dihydroxynapthalene
DPG	=	Diphosphatidylglycerol
DSMZ	=	Deutsche Sammlung von Mikrooganismen and Zellkulturen GmbH
EDTA	=	Disodiummethylenediamine tetraacetate
EMBL	=	European Molecular Biology Laboratory
ESI-TOF-MS	=	Electrospray Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
EtOAc	=	Ethyl acetate
ε	=	Molar absorptivity

g	=	Gram
G	=	*N*-acetylglucosamine
Gal	=	Glalactose
GC	=	Gas chromatography
GenBank	=	National Institute of Health genetic sequence database
Glu	=	Glutamic acid
GluNu	=	Phaspholipids of unknown structure containing glucosamine
Gly	=	Glycerine
h	=	Hour
HCl	=	Hydrochloric acid
HMBC	=	^{1}H-detected heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	=	^{1}H-detected heteronuclear multiple quantum coherance
^{1}H-NMR	=	Proton nuclear magnetic resonance
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HPTLC	=	High performance thin layer chromatography
H_2O	=	Water
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
Hz	=	Hertz
IC_{50}	=	Inhibition concentration
IR	=	Infrared
ISP	=	International *Streptomyces* Project
J	=	Coupling constant
JCM	=	Japan Collection of Microorganisms
KB	=	A human epidermoid carcinoma cell line of the nasopharynx
KNO_3	=	Potassium nitrate
KOH	=	Potassium hydroxide
L	=	Liter
L-DA	=	L-diamino acid
Lyso-PE	=	Lyso-phosphatidylethanolamine
m	=	Multiplet
mm^3	=	Cubic meter
M	=	Molar

$[M+H]^+$	=	Protonated molecular ion
MeCN	=	Methyl cyanide
MEGA	=	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MeOH	=	Methanol
meso-DAP	=	*meso*-Diaminopimelic acid
Methyl-PE	=	methyl-Phosphatidylethanolamine
µg	=	Microgram
mg	=	Milligram
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
MHA	=	Mueller-hinton agar
MHz	=	Mega hertz
MK	=	Menaquinone
µl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
µm	=	Micrometer
mm	=	Millimeter
MS	=	Mass spectroscopy
NaCl	=	Sodium chloride
NaOH	=	Sodium hydroxide
N_2 gas	=	Nitrogen gas
nm	=	Nanometer
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
NOESY	=	Nuclear overhouser effect correlation spectroscopy
NSS	=	Normal saline solution
nt	=	Nucleotide
OH-PE	=	Hydroxyl-phosphatidylethanolamine
PBS	=	Phosphate buffer saline
PC	=	Phosphatidylcholine
PCR	=	Polymerase chain reaction
Pd	=	Palladium
PE	=	Phosphatidylethanolamine
PG	=	Phosphatidylglycerol

PI	=	Phosphatidylinositol
PIMs	=	Phosphatidylinostolmannoside
PME	=	Phosphatidyl-*N*-methylethylethanolamine
ppm	=	Part per million
rDNA	=	Ribosomal deoxynucleic acid
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
rpm	=	Round per minute
s	=	Singlet
SCA	=	Starch caseinate agar
SDA	=	Sabouraud's dextrose agar
sec	=	Second
Si Gel	=	Silica gel
sp.	=	Species
SSC	=	Standard sodium citrate
t	=	Triplet
TAE	=	Tris-acetate
TBE	=	Tris-borate
TCA	=	Trichloroacetic acid
UV	=	Ultraviolet
Vero cell line	=	African monkey kidney cell line
Xyl	=	Xylose